

Министерство здравоохранения Республики Беларусь
УО «Витебский государственный медицинский университет»
Научное общество инфекционистов Республики Беларусь
Ассоциация инфекционистов Санкт-Петербурга и Ленинградской области
Научное общество инфекционистов Республики Узбекистан
Санкт-Петербургская научная общественная организация
«Центр изучения инфекций» ООО «ИНГИЛС»

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ЕВРО-АЗИАТСКИЙ КОНГРЕСС ПО ИНФЕКЦИОННЫМ БОЛЕЗНЯМ

Том 1

Актуальные вопросы инфекционной патологии

Витебск, 5-6 июня 2008 года

INTERNATIONAL EURO-ASIAN CONGRESS ON INFECTIOUS DISEASES

Volume 1

Current problems of infectious pathology

Vitebsk, June 5-6, 2008

**Материалы
Евро-Азиатского конгресса по инфекционным болезням**

УДК 616-022.7:061.3(4)(5)(081/082)

ББК 55.14я431

С 23

Актуальные вопросы инфекционной патологии / Под ред. проф. В.М. Семенова. — Материалы международного Евро-Азиатского конгресса по инфекционным болезням (Витебск, 5–6 июня 2008 г.). — Витебск, 2008. — 274 с.

В материалах международного Евро-Азиатского конгресса по инфекционным болезням представлены статьи ученых и практических врачей стран Европы и Азии, посвященные ряду актуальных вопросов инфекционной патологии. Тематика представлена всеми направлениями инфектологии (новое в этиологии, эпидемиологии, патогенезе, клинике, диагностике, лечении и профилактике инфекционных болезней), кроме гепатологии (статьи, посвященные проблемам экспериментальной, хирургической и терапевтической гепатологии, включены в состав 2 тома настоящего сборника материалов Евро-Азиатского конгресса). Представленная информация будет полезна широкому кругу врачей-инфекционистов и других медицинских специалистов.

Редакционная коллегия:

Ответственный редактор: профессор В.М. Семенов (Беларусь)

Члены редколлегии: профессор Т.И. Дмитраченко (Беларусь); профессор В.М. Цыркунов (Беларусь); академик РАМН, заслуженный деятель науки РФ, профессор Ю.В. Лобзин (Россия); заслуженный врач РФ, доцент В.М. Волжанин (Россия), профессор М.Д. Ахмедова (Узбекистан), профессор М.А. Андрейчин (Украина), профессор Г.У. Алшинбаева (Казахстан)

Ответственный секретарь: доцент И.В. Жильцов (Беларусь)

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УО «Витебский государственный медицинский университет»

(лицензия ЛИ №232 от 30.04.2004 г.)

210602 г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27

Материалы участников конгресса размещены по тематическим разделам в алфавитном порядке по фамилии первого автора



ККУП «Витебский областной центр маркетинга»

210025 г. Витебск, ул. Правды, 32

Ответственная за выпуск — Гречихо О.Т.

Лицензия 02330/0150178 от 13.02.2008 г.

9 1789856 1896029

дикала. Внесение в систему пигментной фракции в количестве 100 мкл вызвало снижение восстановления NBT синего на 31–56%. Следовательно, сине-зеленые пигменты способны не только генерировать супероксидный радикал, но и вызывать его трансформацию. Это обстоятельство побудило нас исследовать действие фракций пигментов на протеолитические реакции.

Для исключения возможных примесей собственных протеаз и иных белков микроорганизма фракции пигмента диализовали в течение 24 ч при температуре 4°C через целлофановую мембрану против деонизированной воды. Подвергнутые такой обработке образцы фракции сине-зеленого пигмента подавляли плазминогенактиваторную способность урокиназы на 55–67, а стрептокиназы — на 35–60%. Фракции пигментов существенно угнетали расщепление сывороточного альбумина α -химотрипсина и папаина на 40–69%, трипсином, субтилизиним и металлопротеиназой *Vac. megaterium* на 20–65%. Эффективность фракций пигментов отдельных штаммов в отношении различных протеиназ была неодинакова. Причины подобных различий требуют проведения дальнейших исследований. Возможно, они обусловлены наличием в составе пиовердина остатков аминокислот и олигопептидов, различающихся по длине цепи. В отдельных экспериментах нами зафиксировано, что фракции пиоцианина (в т.ч. полученная путем экстракции хлороформом) и пиовердина способны вызывать лизис белков в тонком слое агарового геля.

Литература

1. Пыжова Н.С., Никандров В.Н. // Международная конференция «Протеолиз, механизмы его регуляции и роль в физиологии и патологии клетки. Тез. докл.». Минск, 2007. С. 63–65.
2. Пыж А.Э., Никандров В.Н. // Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства. Матер. VI международного науч.-практ. конф. Витебск, 2007. С. 271–272.
3. Пыж А.Э., Никандров В.Н. // Труды Национального научно-исследовательского института медицинской профилактики Минздрава Республики Азербайджан. Баку, 2007, т. I. С. 196–202.
4. Никандров В.Н., Лапушкина Т.Н. // Бюлл. эксперимент. биол. мед. 1993. Т. 105, № 3. С. 277–278.
5. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Пыж А.Э. // Совершенствование осуществления государственного санитарного надзора в Республике Беларусь. Материалы XI съезда гигиенистов и эпидемиологов Республики Беларусь. Минск, 2007. С. 205–211.

ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ КЛЕТКИ *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

Никандров В.Н.^{1,2}, Пыжова Н.С.¹

1. НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ, г. Минск, РБ.
2. Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, РБ

The original results of own researches of the cleavage of protein substrates (fibrin(ogen), thrombin, casein, hemoglobin, gelatin, serum albumin) by extra- and intracellular proteinases of four reference toxigenic and non-toxigenic strains of Corynebacterium diphtheriae and inhibitory analysis are presented. The features of proteolytic properties of purified samples of diphtheria toxin are described. The ability of PW-8 strain of production of protein substances with proteolysis effector properties is demonstrated.

Дифтерия является тяжелым инфекционным заболеванием, однако свойства возбудителя дифтерии изучены далеко не полностью. Немногочисленные и фрагментарные данные литературы свидетельствуют о том, что клетки *Corynebacterium diphtheriae* имеют внутриклеточные и секретируемые протеиназы.

Методом лизиса фибриновых пластин, а также по лизису фибриногена, казеина, тромбина, гемоглобина, сывороточного альбумина или желатина в тонком слое агар-агара изучена активность протеиназ разрушенных клеток или бесклеточных супернатантов бульонных (Лингуда, Мартена) культур *Cor. diphtheriae*, шт. 4895, 10648, PW-8, BB-1–9.

Внеклеточные протеиназы [1]. Фибринолитическая, но не гемоглинолитическая активность супернатантов в первые сутки полностью исчезала или снижалась, что наводит на мысль о

секреции молодыми микробными популяциями ингибиторов отдельных протеиназ. Затем эта активность заметно нарастала с проявлением нескольких видов зависимости: максимум фибринолитической активности совпадал с наибольшим уровнем биомассы (шт. 4895); опережал максимум биомассы (шт. 10648 и PW-8), и, наконец, запаздывал за накоплением микробных клеток (шт. BB-1–9). Динамики фибринолитической и гемоглинолитической активностей не совпадали. Протеиназы супернатантов культуральной жидкости всех штаммов коринебактерий чувствительны к *p*-хлормеркурибензоату (PCMB) и *o*-фенантролину, на 42–100% подавлялись ЭДТА, но не всегда ингибировались этанолом (особенно шт. BB-1–9) и фенилметилсульфонилфторидом (PMSF). У шт. 4895 и 10648 PMSF вызвал даже проявление или резкое увеличение протеолитической активности [1]. Этот обнаруженный парадоксальный эффект нуждается в дальнейшем изучении.

Внутриклеточные протеиназы. Наиболее интенсивно они гидролизовали желатин, за исключением протеиназ шт. 10648, сильнее расщеплявших казеин. Фибрин же и тромбин интенсивно расщепляли только протеиназы высокотоксигенного шт. PW-8. Гидролиз тромбина протеиназами шт. 4895 отчетливо наблюдался, начиная лишь с 3-х суток роста культуры. Токсигенный шт. BB-1–9 не расщеплял и фибриноген [2].

В оптимальных для токсигенеза условиях протеиназы шт. PW-8 расщепляли белки, образуя ряд: желатин > фибриноген > тромбин = казеин > фибрин. При росте на бессывороточной среде Лингуда без отбора R-форм колоний ряд иной: казеин = тромбин > сывороточный альбумин > желатин = фибриноген, а в неоптимальных для токсигенеза условиях в присутствии сыворотки крови зависимость имела вид: фибриноген > сывороточный альбумин = казеин > желатин > тромбин [2]. В этих случаях фибрин не расщеплялся.

В оптимальных для токсигенеза условиях активность внутриклеточных протеиназ не угнеталась PMSF, за исключением шт. 4895 (подавление составило 37%), в ряде случаев лизис белков субстратов даже усиливался в 1,23–4,7 раз. При этом протеолиз сильно угнетался PCMB. Это очень характерно для штамма PW-8. Действие эффектора не проявлялось при расщеплении желатина шт. BB-1–9 и фибриногена шт. 10648. При утрате у колоний морфологических признаков токсигенности внутриклеточные протеиназы шт. PW-8 подавлялись как раз PMSF и были менее чувствительны к PCMB.

ЭДТА полностью подавлял лизис фибрина протеиназами шт. PW-8. В остальных случаях ингибирование не превышало 50%. *o*-фенантролин протеиназы PW-8 угнетал на 80–100%. В остальных же случаях его эффект не превышал 50% либо отсутствовал.

Перехватчики синглетного кислорода подавляли расщепление фибриногена, казеина, желатина на 21–57% либо не влияли на него. Исключением являлось полное подавление азидом желатинолитической активности протеиназ шт. PW-8R. Перехватчики HO-радикала не влияли на фибриногено(казеино)-литическую активность протеиназ штаммов, на 22–30% угнетая расщепление желатина. Специфический перехватчик O₂-радикала — нитротетразолиевый синий (NBT) полностью блокировал гидролиз всех белков протеиназами обоих штаммов. Действие других перехватчиков — адреналина и супероксиддисмутазы зависело от расщепляемого белка: фибринолиз подавлялся полностью, а лизис остальных белков угнетался лишь на 20–40%. Весьма характерно для шт. PW-8 (но не для нетоксигенного 4895) полное подавление его протеолитической активности ароматическим соединением — HOQ.

Протеолитическая активность токсина. Образцы дифтерийного токсина шт. PW-8 (выделены методом солевого фракционирования и адсорбционной хроматографии, LD₅₀ на монослойных культурах фибробластов эмбрионов кур — 1,31 нг/мл, электрофоретическая гомогенность $\geq 95\%$) не расщепляли фибрин и не активировали прочно сорбированный на нем плазминоген. Они медленно активировали водорастворимый плазминоген, подавляли фибринолитическую активность химотрипсина, папаина [3]. Токсин практически не влиял на активаторные свойства стрептокиназы, тканевого активатора плазминогена, фактора роста нервов, а также на фибринолитическую активность пепсина [4]. В 0,01 М фосфатном буфере pH 7,4 образцы дифтерийного токсина расщепляли фибриноген, желатин, сывороточный альбумин быка. Эта активность токсина блокировалась добавками NBT (10⁻²М), но в отличие от внутриклеточных протеиназ, была мало чувствительна к адреналину, супероксиддисмутазе, перехватчи-

кам ОН-радикала, синглетного кислорода, к HOQ. В водно-солевом растворе PMSF, РСМВ, комплексоны слабо влияли ($\pm 10-15\%$) на фибринолитическую активность токсина. Лишь ионы Hg^{2+} угнетали ее на 65%. Обработка токсина 4 М мочевиной вела к угнетению протеолиза PMSF и о-фенантролином на 20–22%, а ионами Hg^{2+} — полностью, тогда как обработка 80% диметилсульфоксидом усилила ингибирование PMSF, ЭДТА и K_4FeCN_6 до 40–60%, а также на 36% увеличила протеолитическую активность в присутствии диэтилдитиокарбамата. Фибринолитическая активность мало изменялась в присутствии РСМВ, азиды или цианида.

Эффекторы протеолиза. Супернатанты трехсуточной культуры *Corynebacterium diphtheriae* шт. РW-8, выращенной на бульоне Лингуда или бульоне Мартена, обрабатывали трихлоруксусной кислотой, осадки растворяли в 0,06М фосфатном буфере рН 7,4 (буфер-растворимая фракция, БФ), а их нерастворившуюся часть — при добавлении NaOH с последующей нейтрализацией (щелочорастворимая фракция, ШФ) [5]. ШФ подавляла фибринолитическую активность папаина и пепсина на 50–75%, плазмина — на 40%, α -химотрипсина — на 20–30% и увеличила плазминогенактиваторную способность стрептокиназы на 35–52%, тканевого активатора плазминогена на 75–155%. Фракции БФ были менее эффективны. Обе фракции увеличивали плазминогенактиваторную способность γ -субъединицы фактора роста нервов на 30–50%. Лишь подобная способность β -субъединицы фактора угнеталась на 50–65% добавками указанных фракций. Наиболее сильное угнетение (на 95%) наблюдалось под действием ШФ, выделенной из культуры, выращенной на бульоне Мартена.

Выводы

Совокупность изложенных оригинальных фактов раскрывает новые аспекты молекулярных основ патогенности возбудителя дифтерии.

Литература

1. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Шатило Н.Л. // Роль антропогенных и природных патогенов в формировании инфекционных и неинфекционных болезней человека. Медико-экологич. аспекты проблемы. Матер. междунар. конфер., Минск, 2002. С. 326–342.
2. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Шапчиц Н.С. // Доклады НАН Беларуси. 2007. Т. 51, № 3. С. 92–97.
3. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. // Известия НАН Беларуси. Серия мед.-биол. наук. 2003. № 3. С. 75–89.
4. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. // Достижения медицинской науки Беларуси», вып. X. Рецензир. научно-практ. ежегодник, Минск, ГУ РНМБ, 2005. С. 42–43.
5. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Шатило Н.Л., Шапчиц Н.С. // Проблемы инфекционной патологии XXI века. Матер. юбил. конфер. посвященной 80-летию НИИЭМ» Минск, 2004. С. 177–191.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ КОРИ, ИЗОЛИРОВАННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В 2004–2007 ГГ.

Самойлович Е.О., Свирчевская Е.Ю., Семейко Г.В., Ермолович М.А.

НИИ эпидемиологии и микробиологии, г. Минск, РБ

During 2004–2007 in Belarus 7 different genetic variants of measles virus were isolated. The virus of D6 genotype (variant Turkey), isolated in 2004, was imported from Armenia. All 47 viruses, revealed in 2006, belonged to genotype D6 (variant Ukraine) but formed 5 different genetic lineages. The virus revealed in 2007 was imported from Thailand and belonged to genotype D5.

Вирус кори представлен единственным серотипом и применяемые вакцины, созданные на основе штамма Эдмонстон и его производных, обеспечивают защиту против всех циркулирующих вирусов кори. Несмотря на выраженную стабильность вируса кори, существующая гетерогенность среди различных штаммов диких вирусов кори дает возможность проведения молекулярно-эпидемиологических исследований, позволяющих определять генотип циркули-

рующих вирусов, их филогенетические взаимоотношения с вирусами, распространенными в других странах, определять пути вирусной трансмиссии, дифференцировать местные и завозные случаи инфекции.

Исследования, направленные на выделение вирусов кори от больных с их последующим молекулярно-генетическим изучением проводятся в Беларуси с 2004 г. в рамках выполнения программы Европейского бюро ВОЗ по элиминации кори к 2010 г. и аналогичной национальной программы.

Материалы и методы.

Клиническим материалом, используемым для обнаружения вируса кори, служили мононуклеары периферической крови, полученные из венозной гепаринизированной крови методом флотации в градиенте плотности фиколю-верографина (1,077), и сывортка крови больных корью. Всего за период 2004–2007 гг. вирусологически обследовано 87 больных корью (по 1 в 2004, 2005 и 2007 гг., 84 — в 2006 г.) с серологически подтвержденным диагнозом (выявлены IgM-антитела к вирусу кори).

Выделение вирусов кори проводили из фракции мононуклеаров периферической крови в культуре клеток Vero-SLAM (линия клеток Vero, экспрессирующая специфический коревой рецептор человека CDw150), лобезно предоставленной доктором Yusuke Yanagi (Медицинский факультет университета Киушу, Япония). Если вирус кори изолировать в культуре клеток не удавалось, предпринимались попытки обнаружения вирусной РНК непосредственно в клиническом материале с использованием гнездовой ПЦР.

Выделение вирусной РНК проводили с помощью набора «QIAamp Viral RNA Mini Kit» (Qiagen, Нидерланды). Амплификацию кДНК вируса кори из вирусосодержащей культуральной жидкости или непосредственно из мононуклеаров периферической крови либо сывортки крови больных выполняли в гнездовой ПЦР со стадией обратной транскрипции [2]. Секвенирование фрагмента N-гена длиной 450 нуклеотидов (нуклеотиды 1233–1682) проводили с использованием коммерческого набора «Thermo Sequenase Cy 5 Dye Terminator Sequencing Kit» (Amersham Biosciences, США). Анализ нуклеотидных последовательностей и построение филограммы выполняли с помощью программ «BioEdit» и «Mega версии 3.1».

Результаты и обсуждение. Исследование клинического материала позволило выделить вирус кори в культуре клеток от 45 больных. Вирус удалось выделить только из мононуклеарных клеток, полученных из венозной крови, собранной не позднее 8-го дня с момента появления сыпи.

Для 20 образцов (19 образцов мононуклеарных клеток, из которых вирус выделить не удалось, и 1 сывортка крови) была предпринята попытка детекции вирусной РНК непосредственно из клинического материала с использованием гнездовой ПЦР со стадией обратной транскрипции. Как известно, этот метод позволяет не только выявлять РНК вируса кори, но и получать фрагмент генома, достаточный для генотипирования [3]. РНК вируса кори была выявлена в 9 (45,0 \pm 11,4%) из 20 исследованных образцов, в том числе и в сывортке крови.

На основании результатов секвенирования нуклеотидных последовательностей фрагмента N-гена длиной 450 нуклеотидов 49 вирусов кори и последующего филогенетического анализа установлено, что в течение 2004–2007 гг. на территории Республики Беларусь были обнаружены 7 различных генетических вариантов вирусов кори.

Изолированный в 2004 г. вирус кори был выделен от больной, заболевшей корью после возвращения из Армении. Как известно, в 2004 г. в Армении имела место достаточно крупная вспышка кори (более 1000 заболевших). Результаты секвенирования N-гена этого вируса свидетельствовали о его принадлежности к генотипу D6 (вариант Турция). Известно, что в 2004 г. в США был зарегистрирован также завозной случай кори из Армении. Выделенный от больного вирус принадлежал тому же генетическому варианту (генотип D6, вариант Турция). Несмотря на то, что ни один из больных корью в Армении не был вирусологически обследован, результаты обследования двух случаев кори, завезенных из Армении (одного — в Беларусь, другого — в США), позволяют утверждать, что вспышка кори в Армении в 2004 г. была вызвана вирусом кори генотипа D6.

В течение 2006 г., когда в Республике Беларусь отмечалась относительно небольшая вспышка кори — 149 случаев, вирусы кори были выявлены у 52 больных [1,4]. При сравнении нуклеотидных последовательностей фрагмента N-гена 47 секвенированных вирусов кори с референс-штаммами было установлено, что все выявленные в стране вирусы